沙葱萤叶甲热激蛋白基因 *GdHsp*70 的克隆与表达模式分析

谭 瑶[1], 张 玉[1], 霍志家[1], 周晓榕[1], 单艳敏[2], 庞保平[1,*]

(1. 内蒙古农业大学草原昆虫研究中心, 呼和浩特 010019; 2. 内蒙古草原工作站, 呼和浩特 010020)

摘要:【目的】本研究旨在克隆沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* 热激蛋白 Hsp70 基因,并对其进行序列和表达模式分析,探讨该基因在沙葱萤叶甲生长发育及响应温度胁迫方面的作用。【方法】采用 RT-PCR 和 RACE 技术从沙葱萤叶甲 2 龄幼虫中克隆 Hsp70 基因,并进行生物信息学分析;用 WoLF PSORT 在线软件进行亚细胞定位预测;采用实时荧光定量 PCR 检测该基因在沙葱萤叶甲成虫不同组织(头、胸和腹)中、不同发育阶段(卵、1 - 3 龄幼虫、蛹、雌雄成虫)、不同温度(-14, -10, -5, 0, 5, 10, 15, 20, 25 和 30℃)处理 1 h 的 2 龄幼虫及 0℃下分别处理 0 min, 15 min, 30 min, 1 h, 1.5 h, 2 h 和 3 h 时卵中的相对表达量。【结果】克隆获得一个沙葱萤叶甲 Hsp70 基因并命名为 *GdHsp*70(GenBank 登录号: KY460462),该基因全长2 340 bp,开放阅读框(ORF) 1 899 bp,编码 632 个氨基酸,预测蛋白质分子量为 70.12 kD,等电点(pI)为 4.79,无跨膜区,无信号肽。蛋白质亚细胞定位预测该蛋白主要位于细胞质内。蛋白质结构域分析表明,GdHsp70 有 3 个功能保守区。同源比对与系统进化分析表明,GdHsp70 与分类学关系上较为接近的昆虫的同源蛋白间有较高的相似度。组织特异性和不同发育阶段表达分析表明,*GdHsp*70 在沙葱萤叶甲成虫胸部和卵期表达量最高;高温和低温胁迫均能诱导沙葱萤叶甲 2 龄幼虫体内 *GdHsp*70 的表达,其中 -10℃处理 1 h 表达量最高;0℃低温处理卵 15 min 至 3 h 后均能诱导 *GdHsp*70 不同程度的表达上调,其中处理 1 h 上调幅度最大。【结论】沙葱萤叶甲 *GdHsp*70 与该虫的生长发育相关,并对高低温胁迫的响应有重要作用。

关键词: 沙葱萤叶甲; 热激蛋白 70; 基因克隆; 表达分析; 温度胁迫

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2017)08-0865-11

Molecular cloning and expression profiling of the heat shock protein gene *GdHsp*70 in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae)

TAN Yao[1], ZHANG Yu[1], HUO Zhi-Jia[1], ZHOU Xiao-Rong[1], SHAN Yan-Min[2], PANG Bao-Ping[1,*]

(1. Research Center for Grassland Entomology, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China; 2. Inner Mongolia Grassland Station, Hohhot 010020, China)

Abstract:【Aim】This study aims to clone the heat shock protein Hsp70 gene in *Galeruca daurica*, and to analyze the gene sequence and mRNA expression profiles so as to explore the function of Hsp70 gene in the development and its responses to thermal stress in *G. daurica*.【Methods】The full-length cDNA of a Hsp70 gene was cloned and identified from the 2nd instar larvae of *G. daurica* using RT-PCR and RACE technique, and the putative amino acid sequence was analyzed by bioinformatics methods. The relative expression levels of the Hsp70 gene in different adult tissues (head, thorax and abdomen), different developmental stages (egg, the 1st - 3rd instar larva, pupa and female and male adult), the 2nd instar larvae exposed to different temperatures (-14, -10, -5, 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30℃ for 1 h), and eggs exposed to 0℃ for 0 min, 15 min, 30 min, 1 h, 1.5 h, 2 h, and 3 h, respectively, were

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360441)

作者简介: 谭瑶, 女, 1985 年 3 月生, 内蒙古呼和浩特人, 博士, 讲师, 研究方向为昆虫生态与分子生物学, E-mail: 850310.tanhuaf4@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: pangbp@imau.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-03-04; 接受日期 Accepted: 2017-06-12

measured using real-time quantitative PCR method. 【Results】A heat shock protein 70 gene was cloned from *G. daurica*, and named *GdHsp*70 (GenBank accession no. KY460462), which is 2 340 bp in length and contains an open reading frame (ORF) of 1 899 bp, encoding 632 amino acid residues. The putative protein is 70.12 kD with an isoelectric point (pI) of 4.79, and has no transmembrane region and signal peptide. Subcellular localization prediction revealed that *GdHsp*70 is mainly located in the cytoplasm. Protein domain analysis showed that GdHsp70 has three highly conserved domains. Homologous alignment and phylogenetic analysis demonstrated that GdHsp70 has high similarity with the Hsp70 proteins from other insects which are highly close to *G. daurica* based on taxonomy. Tissue- and developmental stage-specific mRNA expression profiling showed that *GdHsp*70 had the highest expression levels in the adult thoraxes and eggs. Both heat and cold stress could induce the mRNA expression of *GdHsp*70 in the 2nd instar larvae with the highest expression level at −10℃ for 1 h. *GdHsp*70 was up-regulated in *G. daurica* eggs exposed to 0℃ for 15 min to 3 h, with the highest expression level at 1 h after treatment. 【Conclusion】*GdHsp*70 might be associated with the development and play an important role in response to heat and cold stress in *G. daurica*.

Key words: *Galeruca daurica*; Hsp70; gene cloning; expression profiling; thermal stress

沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* (Joannis)属鞘翅目(Coleoptera)叶甲科(Chrysomelidae)萤叶甲亚科(Galerucinae),在我国分布于内蒙古、新疆和甘肃等地,国外分布于俄罗斯西伯利亚、蒙古国和朝鲜半岛(杨星科等, 2010)。该虫从 2009 年开始在内蒙古草原上突然大面积暴发成灾,呈现逐年加重的趋势,发生范围从 2009 年锡林郭勒盟的 4 个旗县已迅速扩大到 2016 年锡林郭勒盟、呼伦贝尔市、乌兰察布市、巴彦淖尔市、阿拉善盟以及鄂尔多斯市等 6 个盟市的 20 个旗县。沙葱萤叶甲发生危害地区均为有葱属植物的退化草原和荒漠草原,该类地区本身植被稀疏、土壤沙化严重、生产力低下。近年来由于该虫的发生危害,不仅严重影响当地的畜牧业发展、降低牧民收入,而且使草地退化更加严重,生态环境日益恶化(张鹏飞等, 2015)。

热休克蛋白(heat shock proteins, Hsps)作为应激蛋白或分子伴侣,在不同生物体内广泛存在,在进化上具有高度保守性(Si *et al.*, 2016),主要涉及多种生物进程:蛋白质折叠、装配、跨膜转导等(Jiang *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2016)。在昆虫学研究中,主要依据热激蛋白的分子量、氨基酸序列及功能,将其分为小热激蛋白(small Hsps)、Hsp60、Hsp70、Hsp90 及协同伴侣 Hsp40(Gkouvitsas *et al.*, 2009)。昆虫中的热激蛋白主要以组成型表达和各种逆境因子诱导合成表达为主(King and MacRae, 2015)。热激蛋白能够维持细胞内环境稳定,促进变性蛋白质修复,在机体受逆境胁迫后保护蛋白、多肽,以免遭受变性(Huang and Kang, 2007),其功能主要是参与蛋白质合成、折叠、装配及转运等生命活动(Feder and Hofmann, 1999)。

Hsp70 是热休克蛋白家族的重要成员之一,其高度保守性也使得对它的研究相当广泛(Boorstein *et al.*, 1994; Daugaard *et al.*, 2007)。Hsp70 编码包括诱导型的 Hsp70 和组成型的 Hsc70 (heat shock cognate 70)。通常情况下,Hsp70 在细胞内表达量很低,在热应激或其他环境胁迫作用下,表达量迅速增加;而 Hsc70 在所有细胞内均表达,但不受外界刺激诱导(Boutet *et al.*, 2003; Franzellitti and Fabbri, 2005)。Hsp70 在生物体内的生理功能、抗逆性、环境监测中具有重要作用(King and MacRae, 2015),特别是在生物体获得热忍耐力中起了重要作用(Sørensen *et al.*, 2003; 李明等, 2008; Yang *et al.*, 2012),选用 Hsp70 作为一种分子标记物,可从分子水平上了解该物种的抗逆机制(Clark and Peck, 2009)。一些研究表明,适度的低温驯化可提高昆虫的抗寒能力,并且与驯化持续的时间有关(Jing and Kang, 2003)。

沙葱萤叶甲在内蒙古草原一年发生 1 代,以成虫滞育越夏,以卵滞育越冬(昊翔等, 2015; Zhou *et al.*, 2016)。已有研究表明,沙葱萤叶甲越冬卵和幼虫具有很强的抗寒能力(李浩等, 2014, 2015; 高靖淳等, 2015),但其抗寒的机制并不清楚,Hsp70 在生物体获得热忍耐力中起重要作用,本文拟从 Hsp70 入手,探索其在沙葱萤叶甲抗寒中的作用。本研究从沙葱萤叶甲中克隆获得了一个 Hsp70 基因,序列分析后检测了该基因的时空表达模式,并通过研究 2 龄幼虫在不同温度胁迫下该 Hsp70 基因的 mRNA 表达变化情况,分析该虫对不同温度胁迫的

响应。为了解 0℃低温驯化对沙葱萤叶甲热击蛋白表达的影响，实验还通过 0℃低温对卵处理不同时间后，测定 Hsp70 基因的 mRNA 表达变化情况，分析该基因参与抗寒的主要原因，以期寻找影响沙葱萤叶甲抗逆能力的新靶标，为制定新的防治对策奠定理论基础。

1　材料与方法

1.1　供试材料及处理

2016 年春季将 2015 年秋季采集的沙葱萤叶甲越冬卵（内蒙古锡林浩特市阿尔善苏木采集）放入 25 ±1℃、相对湿度 70% ±5%、光周期 16L∶8D 的人工气候箱中培养，待幼虫孵化后，以实验室内种植的韭菜 *Allium tuberosum* Rottl. *ex* Spreng 作为食料进行连续饲养，作为供试虫源。

1.1.1　沙葱萤叶甲成虫不同组织部位的收集：选取羽化第 3 天的沙葱萤叶甲成虫，在显微镜下用解剖剪分别剪下头、胸和腹 3 部分，迅速投入液氮中转至 –80℃冷冻备用，每个处理 3 个生物学重复。

1.1.2　沙葱萤叶甲不同发育期的收集：分别选取沙葱萤叶甲卵、1 – 3 龄幼虫、蛹、雌成虫和雄成虫（每个虫期均选取 3 日龄的个体），各个虫期的沙葱萤叶甲至少取 1 g，迅速投入液氮中转至 –80℃冷冻备用，每个处理 3 个生物学重复。

1.1.3　不同温度处理：选取沙葱萤叶甲 2 龄幼虫分别在 –14，–10，–5，0，5，10，15，20，25 和 30℃下处理 1 h 后，迅速投入液氮中转至 –80℃冷冻备用，每个处理重复 3 次，5℃处理作为基准。

1.1.4　低温处理：将产下 3 d 的沙葱萤叶甲卵分别置于 0℃下处理 0 min，15 min，30 min，1 h，1.5 h，2 h 及 3 h 之后迅速收集卵投入液氮，–80℃冷冻备用，每个处理重复 3 次。0℃下处理 0 min 实际为不做低温处理的试虫，将其作为对照组。

1.2　沙葱萤叶甲 Hsp70 基因克隆

1.2.1　引物制备：根据本实验室组装的沙葱萤叶甲转录组数据，选取一段被注释为 Hsp70 的基因序列，设计特异性引物，扩增一段预计在 150 bp 的基因片段，再根据已获得的特异性序列，设计两个半巢式引物 Hsp70-5′GSP1 和 Hsp70-5′GSP2 及 Hsp70-3′GSP1 和 Hsp70-3′GSP2 用于 RACE 扩增（表 1）。

表 1　实验用引物

Table 1　Primers used in the study

引物 Primers	引物序列（5′ – 3′） Primer sequences	用途 Purpose	目的片段长度（bp） Target fragment size
GdHsp70-f GdHsp70-r	ACAGGCCACAAAAGATGCAG CATCGAAAGTTCCACCACCC	扩增 Hsp70 基因片段 Amplification of Hsp70 gene fragment	155
GdHsp70-5′GSP1 GdHsp70-5′GSP2	TGTCAAAGTCCTCACCTCCCAA CCCAAGTGAGTATCTCCAGCAGT	5′RACE	1 186
GdHsp70-3′GSP1 GdHsp70-3′GSP2	CTGTAGTCGCAGTCGGTCAA TCTTTCGCCCCACCTTCTGT	3′RACE	1 500
GdHsp70-F GdHsp70-R	TTATTGCCAACGACCAGG CTCGCATCCACAAGCACA	全长序列扩增 Full-length sequence amplification	1 870
qGdHsp70-F qGdHsp70-R	CACAACGTCAGGCCACAAAA AAAGTACCGCCACCCAAATC	实时荧光定量 PCR 检测目的基因 Target gene amplification in real-time quantitative PCR	142
qSDHA-F qSDHA-R	GGGAGACCACAATCTCCTCA AGCTGGTGCTCCTAAGTCCA	实时荧光定量 PCR 检测内参基因 Reference gene amplification in real-time quantitative PCR	192

1.2.2　RNA 提取与 cDNA 克隆：将 1.1 节中从野外采集的沙葱萤叶甲卵带回实验室，孵化至 2 龄幼虫，在液氮中充分研磨，按 TaKaRa Mini RNA 提取试剂盒（Takara，Dalian，China）的要求提取总 RNA。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的总 RNA 的完整性，用超微量紫外分光光度计（NanoPhotometer P-Class 6453，Implen GmbH，Munich，Germany）测定核酸纯度和浓度。高质量的 RNA 将按照 PrimeScript 1st Strand cDNA 合成试剂盒（Takara，Dalian，China）提供的说明书进行 cDNA 第 1 链的合成。

1.2.3　PCR 扩增、纯化及鉴定：PCR 反应总体系为 50 μL：PCR Buffer 5 μL，dNTPs 2 μL，模板 1 μL，正反向引物各 2 μL，Takara La Taq 酶 0.6 μL，ddH_2O 37.4 μL。反应条件：94℃预变性 5 min；94℃变性 20 s，55℃退火 20 s，72℃延伸 30 s，共 30

个循环；72℃ 10 min。反应结束后取 5 μL 扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。PCR 仪为 T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, America)。将预测目的片段大小一致的条带进行切胶回收测序。

1.2.4 3′与 5′cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)：应用 SMARTer® RACE 5′/3′ Kit (Clontech)进行 3′与 5′RACE。RACE 操作步骤按试剂盒说明书要求进行，兼用半巢式 PCR 扩增，电泳检测后，对目标片段进行纯化回收后送北京六合华大公司测序。

1.3 沙葱萤叶甲 Hsp70 基因序列分析

利用 NCBI 上(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)的 Blast 工具进行核苷酸和氨基酸序列的相似性分析；所得片段应用 DNAMAN V6.0 (Lynnon Biosoft, Canada)进行序列拼接，在线软件 ORF Finder (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)预测 Hsp70 基因的开放阅读编码框；DNAMAN 预测分子量及等电点；网上在线工具 SignalP, TMHMM, SMART, WoLF PSORT 等对蛋白信号肽、跨膜结构、结构域、亚细胞定位进行预测；采用 SWISS-MODEL (http://swissmodel.expasy.org/)进行同源建模及 3D 结构预测预测分析；分别使用 DNAMAN 和 MEGA 6.0 进行同源性分析和构建系统发育树。

1.4 实时荧光定量 PCR

根据 Hsp70 基因的全长序列，设计一对荧光定量 PCR 引物(表 1)用于检测沙葱萤叶甲 Hsp70 基因。琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDHA)被证实在沙葱萤叶甲不同处理条件下可以保持较好的表达稳定性(Tan *et al*., 2016)，被用作内参基因；定量实验在 FTC-3000P 荧光定量 PCR 仪上进行(Funglyn Biotech, Canada)。PCR 反应体系 25 μL：600 ng/μL 的 cDNA 模板 1 μL，SYBR Green Real-time PCR Master Mix (Takara, No. DRR420S)染料 12 μL，10 umol/L 的引物 0.5 μL，灭菌水 11.5 μL。反应条件：95℃ 5 min；95℃ 10 s，52℃ 15 s，72℃ 20 s，40 个循环。每个实验进行生物学重复 3 次，每次进行 4 组技术重复。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行 PCR 相对定量分析(Livak and Schmittgen, 2001)。同一处理组下基因表达量差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA)，同一因素中，对照组和处理组之间 *Hs*p70 mRNA 相对表达水平差异用 *t* 检验；同一因素下不同处理组 *Hsp*70 相对表达量差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA, LSD 法)，统计用应用 SPSS 16.0 统计软件进行。

2 结果

2.1 沙葱萤叶甲 *GdHsp*70 基因克隆与序列分析

以沙葱萤叶甲 cDNA 作为模板，一对特异性引物 GdHsp70-f 及 GdHsp70-r 扩增获得 150 bp 的特异性条带，序列比对后发现其核苷酸序列与其他昆虫的 Hsp70 序列有高度相似性。根据这条片段分别设计 3′和 5′引物进行 RACE 扩增全长序列。根据中间序列，分别扩增获得了1 686 bp的 3′端和 822 bp 的 5′端序列，经拼接后获得2 340 bp的全长序列，命名为 *GdHsp*70 (GenBank 登录号：KY460462)。*GdHsp*70 基因开放阅读框(ORF)长 1 899 bp，编码 632 个氨基酸，3′非翻译区为 306 bp，包含 polyA 尾巴，具有加尾信号 AATAA。编码蛋白质分子量为 70.12 kD，等电点(pI)为 4.79。无跨膜区，无信号肽。GdHsp70 蛋白质具有 Hsp70 蛋白质家族特征序列：IDLGTTYS(第 9 – 16 位氨基酸)，IFDLGGGTFDVSLL(第 197 – 209 位氨基酸)，IVLVGGSTRIPKVQQ(第 334 – 348 位氨基酸)，在 131 – 138 位氨基酸处有 1 个 ATP/GTP 结合位点，内质网特征元件 RDEL(第 629 – 632 位氨基酸)(图 1)。蛋白质亚细胞定位预测该蛋白主要位于细胞质内。二级结构预测表明，GdHsp70 蛋白的 α-螺旋(alpha helix)、延伸链(extended strand)、无规则卷曲(random coil)的比例分别为 30.9%，22.5% 和 47.1%。以牛的 Heat shock cognate hsc70 (aa1 – 554)蛋白质(SMTL ID: 1yuw.1)为模型预测 GdHsp70 蛋白的 3D 结构为同源 Hsp70，相似性为 72.5%。

2.2 沙葱萤叶甲 GdHsp70 同源比对及系统进化分析

用 GdHsp70 推导出的氨基酸序列在 GenBank 上进行 BlastP 比对分析，显示与其他已知的 Hsp70 基因有较高的同源性。为检测 GdHsp70 的保守性及不同物种间的 Hsp70 的亲缘关系，从 NCBI 的 GenBank 中下载了 13 种昆虫以及 1 种农业螨类的 Hsp70 氨基酸序列，与推导出的 GdHsp70 氨基酸序列进行同源性分析。结果显示(表 2)，沙葱萤叶甲 GdHsp70 与其他昆虫种 Hsp70 氨基酸序列一致性均超过 60%，其中与马铃薯叶甲 *Leptinotarsa decemlineata* Hsp70 的一致性最高(89.1%)。

```
1     CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGCGATTTGATTGCAGTCACTGCTGTAGAGAACACGTAATTTAAGTATTTATTAAAGAATTGTCTGCAA
121   CTATATAATTTAAAGATGGCTAAAGCACCAGCTGTAGGTATTGATTTGGGAACAACATACTCTTGTGTCGGTGTATTCCAACACGGAAAAGTCGAAATTATTGCCAACGACCAGGGTAAT
1                    M A K A P A V G I D L G T T Y S C V G V F Q H G K V E I I A N D Q G N
241   AGAACCACACCTTCATATGTGGCTTTCACAGATACGGAACGTCTCATTGGAGATGCCGCCAAAAACCAAGTCGCCATGAATCCCAACAACACAATTTTTGATGCAAAACGTCTTATTGGT
36     R T T P S Y V A F T D T E R L I G D A A K N Q V A M N P N N T I F D A K R L I G
361   CGTCGATTTGACGATTCGGCCGTACAATCAGACATGAAACATTGGCCTTTCGAAGTCATTAACGATGGCGGCAAACCAAAAATTAAAGTAGCCTACAAGGGAGAAGACAAATCGTTTTAC
76     R R F D D S A V Q S D M K H W P F E V I N D G G K P K I K V A Y K G E D K S F Y
481   CCCGAAGAAGTCAGTTCAATGGTGCTCACGAAAATGAAGGAAACTGCCGAAGCTTACCTCGGTAAAAATGTCACAAATGCTGTTATCACAGTACCTGCTTATTTCAACGATTCACAACGT
116    P E E V S S M V L T K M K E T A E A Y L G K N V T N A V I T V P A Y F N D S Q R
601   CAGGCCACAAAAGATGCAGGAGCGATAGCTGGTTTGAATGTTTTACGAATTATTAATGAACCAACAGCAGCAGCATTAGCATATGGCCTAGATAAAAATTTGAAAGGTGAGAAGAATGTC
156    Q A T K D A G A I A G L N V L R I I N E P T A A A L A Y G L D K N L K G E K N V
721   CTCATATTCGATTTGGGTGGTGGAACTTTCGATGTCTCACTTTTGACTATTGATAACGGAGTTTTTGAAGTAGTAGCCACAAATGGTGACACACATTTGGGAGGTGAAGATTTCGATCAG
196    L I F D L G G G T F D V S L L T I D N G V F E V V A T N G D T H L G G E D F D Q
841   AGAGTCATGGATTACTTTATCAAATTGTACAAGAAAAAGAAGGGCAAGGATATCAGGAAAGATAACAGAGCTGTACAGAAACTCAGAAGAGAAGTCGAAAAGGCAAAGAGAGCTCTATCT
236    R V M D Y F I K L Y K K K K G K D I R K D N R A V Q K L R R E V E K A K R A L S
961   TCAAACCACCAAGTCAGAATTGAAATTGAATCTTTCTTCGATGGTGATGATTTCTCTGAATCACTAACAAGAGCCAAATTTGAAGAATTGAACATGGATCTTTTCCGTTCCACAATGAAA
276    S N H Q V R I E I E S F F D G D D F S E S L T R A K F E E L N M D L F R S T M K
1081  CCAGTTCAAAAAGTATTGGAAGATGCCGATATGAACAAAAAAGACGTGGACGAAATTGTACTTGTAGGAGGTTCGACTCGTATTCCCAAAGTACAACAACTCGTTAAAGAATTCTTCAAT
316    P V Q K V L E D A D M N K K D V D E I V L V G G S T R I P K V Q Q L V K E F F N
1201  GGCAAAGAACCATCCAGAGGTATCAACCCCGATGAAGCTGTAGCTTATGGAGCTGCCGTTCAAGCTGGTGTACTATCAGGTGAACAAGACACCGATGCAATTGTACTATTGGACGTCAAT
356    G K E P S R G I N P D E A V A Y G A A V Q A G V L S G E Q D T D A I V L L D V N
1321  CCTTTGACTATGGGTATCGAAACTGTCGGAGGTGTGATGACGAAACTCATCCCACGTAACACTGTCATTCCCACAAAGAAATCTCAAATATTCTCAACTGCTTCTGACAGTCAACACACT
396    P L T M G I E T V G G V M T K L I P R N T V I P T K K S Q I F S T A S D S Q H T
1441  GTTACGATTCAAGTATACGAAGGAGAACGTCCAATGACCAAGGATAATCACTTGTTGGGTAAATTCGACCTGACTGGCATTCCACCAGCACCTAGAGGCGTACCACAAATTGAAGTTACA
436    V T I Q V Y E G E R P M T K D N H L L G K F D L T G I P P A P R G V P Q I E V T
1561  TTCGAAATTGATGCTAATGGTATCTTACAAGTATCTGCCGAAGACAAAGGAACCGGAAACAGGGAAAAGATCGTCATTACCAATGACCAAAACAGGCTTACACCTGACGACATAGACCGT
476    F E I D A N G I L Q V S A E D K G T G N R E K I V I T N D Q N R L T P D D I D R
1681  ATGATCAGAGACGCCGAGAAATTCGCCGATGAAGATAAAAAATTGAAAGAAAGAGTAGAGGCTAGGAACGAATTGGAAAGTTACGCTTATTCATTGAAGAATCAAATAAACGACAAAGAA
516    M I R D A E K F A D E D K K L K E R V E A R N E L E S Y A Y S L K N Q I N D K E
1801  AAGTTGGGTGCCAAGTTGTCCGATGACGAGAAGACTAAAATGGAAGAGGCCATCGACGAGAAAATTAAATGGTTAGAAGATAACCAAGATACCGAAGCGGAAGATTACAAGAAACAAAAG
556    K L G A K L S D D E K T K M E E A I D E K I K W L E D N Q D T E A E D Y K K Q K
1921  AAGGCATTGGAAGACATAGTGCAACCGATCATCGCTAAGTTATACCAAGGAGCCGGCGGAGCACCACCTCCGACCAGTGACGATGACGACGAATTAAATAGAGATGAATTGTGAGCAGAT
596    K A L E D I V Q P I I A K L Y Q G A G G A P P P T S D D D D E L N R D E L *
2041  TTGTAGGCCAAAAAGACTGAAAAAACTTGTGTGCTTGTGGATGCGAGAGATAGATGAAGAGTGAGTGTTCTTTGGGTGATATTTAATTTTTTTTTCTGTTTTGTATTTCTGCGTGTAATA
2161  GGAATTTTGTAAATTGATTCGTCTAAGGCGAACGACTTTATTTATTTATGTCAAATATGGATGTATGATTTGTGATATTTTTTTTTATTATTTTTAAACAAAAATAAATTGTACATGTA
2281  TATTTGAATCATTCCCTTTTCGTGTAATTTTTCAATAAAATTACTTGAAAAAAAAAAAAA
```

图 1　沙葱萤叶甲 *GdHsp*70 基因的碱基序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *GdHsp*70 in *Galeruca daurica*

起始密码子 ATG 用粗体标出，终止密码子 TGA 用星号标出。方框中为 Hsp70 家族签名序列，下划线部分表示 ATP/GTP 结合位点。The initiation codon ATG is shown in bold, and the termination codon TGA is marked with an asterisk. Hsp70 family signature sequences are shown in boxes, and the ATP/GTP-binding site is underlined.

从 NCBI 数据库中搜索来自鳞翅目、膜翅目、双翅目、鞘翅目、半翅目及蛛形纲螨类的 Hsp70 的氨基酸序列总计 25 条与推导的沙葱萤叶甲 Hsp70 氨基酸序列构建 NJ 系统进化树（图 2）。结果显示，鳞翅目、膜翅目、双翅目及螨类都分别单独聚为一个分支；半翅目的烟粉虱 *Bemisia tabaci*、灰飞虱 *Laodelphax striatella* 及褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 分别单独聚为一支，但种之间亲缘关系较远；鞘翅目异色瓢虫 *Harmonia axyridis* 与花绒寄甲 *Dastarcus helophoroides* 聚在一起，与其他鞘翅目昆虫亲缘关系较远；而沙葱萤叶甲与同属鞘翅目的马铃薯叶甲 *L. decemlineata* 聚为一支，与同一目的大猿叶甲 *Colaphellus bowringii*、中华豆芫菁 *Epicauta chinensis* 亲缘关系很近。聚类结果表明，沙葱萤叶甲 Hsp70 蛋白序列与分类学关系上较为接近的物种的同源蛋白间有较高的相似度。

2.3　*GdHsp*70 基因的表达模式分析

沙葱萤叶甲 *GdHsp*70 在成虫不同部位表达量存在极显著差异（$F = 62.04$；$df = 2$；$P < 0.01$），其中胸部表达量最高（4.21），其次腹部（2.13），最低为头部（1.00）（图 3：A）。*GdHsp*70 表达量在不同发育阶段存在极显著差异（$F = 27.42$；$df = 6$；$P < 0.01$），其中在卵期表达量远高于其他发育阶段，其次为 1 龄幼虫，其他发育阶段间差异不显著（图 3：B）。

沙葱萤叶甲 2 龄幼虫经不同温度处理 1 h，*GdHsp*70 表达量存在极显著差异（$F = 312.08$；$df = 9$；$P < 0.01$），-10℃低温处理远高于其他温度处理，相对表达量达 6.47 倍；除 -14℃处理与 5℃处理无显著差异外，其他温度处理下的表达量均显著高于 5℃下的表达量（图 4：A）。沙葱萤叶甲卵在 0℃下处理不同时间后，与不处理对照（0 min）相比，

表 2 沙葱萤叶甲与其他昆虫种 Hsp70 氨基酸序列比对

Table 2 The amino acid sequence alignment of Hsp70 between *Galeruca daurica* and other insect species

	同源矩阵 Homology matrix														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	–	62.2	63.3	63.0	63.5	63.0	69.1	63.3	68.0	89.1	68.3	62.6	78.9	63.1	64.4
2	0.38	–	86.1	79.5	82.7	80.2	73.5	85.0	73.8	58.8	75.5	80.5	59.0	84.1	87.1
3	0.37	0.14	–	80.4	80.7	79.1	73.4	90.5	74.5	60.6	75.3	79.3	58.5	89.5	93.3
4	0.37	0.21	0.20	–	78.5	80.9	74.7	79.3	75.4	59.7	76.1	78.6	58.4	78.7	80.3
5	0.36	0.17	0.19	0.22	–	78.0	74.6	81.6	74.8	59.7	75.3	78.9	58.7	78.4	81.4
6	0.37	0.20	0.21	0.19	0.22	–	72.7	78.8	74.0	60.4	73.5	76.7	58.9	77.2	81.6
7	0.31	0.27	0.27	0.25	0.25	0.27	–	71.9	91.9	63.3	91.4	72.5	62.8	73.4	74.1
8	0.37	0.15	0.10	0.21	0.18	0.21	0.28	–	72.8	60.2	73.3	79.4	58.8	85.9	89.4
9	0.32	0.26	0.26	0.25	0.25	0.26	0.08	0.27	–	63.1	93.3	73.3	62.7	73.8	75.2
10	0.11	0.41	0.39	0.40	0.40	0.40	0.37	0.40	0.37	–	25.0	25.1	24.4	23.9	24.1
11	0.32	0.25	0.25	0.24	0.25	0.27	0.09	0.27	0.07	0.75	–	73.9	61.8	74.5	75.1
12	0.37	0.20	0.21	0.21	0.21	0.23	0.28	0.21	0.27	0.75	0.26	–	58.7	78.5	78.8
13	0.21	0.41	0.42	0.42	0.42	0.41	0.37	0.41	0.7	0.76	0.38	0.41	–	59.5	59.8
14	0.37	0.16	0.11	0.21	0.22	0.23	0.27	0.14	0.26	0.76	0.26	0.22	0.41	–	88.4
15	0.36	0.13	0.07	0.20	0.19	0.18	0.26	0.11	0.25	0.76	0.25	0.21	0.40	0.12	–
	距离矩阵 Distance Matrix														

物种名称及其 Hsp70 基因的 GenBank 登录号 The species names and the GenBank accession numbers of their Hsp70 genes：1：沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica*（KY420426）；2：烟粉虱 *Bemisia tabaci*（HM367079.1）；3：家蚕 *Bombyx mori*（AB035326.1）；4：致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*（XM_001861403.1）；5：花绒寄甲 *Dastarcus helophoroides*（KU050682.1）；6：果蝇 *Drosophila auraria*（AJ001365.1）；7：大猿叶甲 *Colaphellus bowringii*（EF668009.1）；8：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（HM593518.1）；9：灰飞虱 *Laodelphax striatella*（KP994340.1）；10：马铃薯叶甲 *Leptinotarsa decemlineata*（KC544269.1）；11：东亚飞蝗 *Locusta migratoria*（AY299637.3）；12：褐飞虱 *Nilaparvata lugens*（JQ782193.1）；13：桔红蛾 *Panonychus citri*（GQ495085.1）；14：小菜蛾 *Plutella xylostella*（AB325801.1）；15：甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（FJ862049.1）.

*GdHsp*70 表达量均有所升高（$F=27.42$；$df=6$；$P<0.01$），但只有 0℃下 1 h 处理表达量显著高于不处理对照（36 倍）外，其他处理与不处理对照差异未达到显著水平（图 4：B）。

3 讨论

本研究通过 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得了沙葱萤叶甲 Hsp70 基因家族的一个基因，命名 *GdHsp*70（GenBank 登录号：KY4204326），经氨基酸序列分析表明该基因具有 3 个 Hsp70 家族的签名序列及一个 ATP/GTP 结合位点。有报道认为 Hsp70 家族基因的 C 端是否具有多个 GGXP 四肽重复序列是区分组成性 Hsc70 和诱导性 Hsp70 两个亚家族的重要标志（Schmid *et al*., 1994；Wu *et al*., 2001），并未发现 *GdHsp*70 基因靠近 C 端多个 GGXP 的四肽重复序列，进一步鉴定其为一个诱导型 Hsp70 基因。同源性分析显示不同昆虫的 Hsp70 家族基因具有较高的保守性，GdHsp70 蛋白与分类学关系上较为接近的昆虫的同源蛋白间有较高的相似度，但是半翅目同翅亚目昆虫的 Hsp70 基因序列间的相似度较低，表现为烟粉虱的两个 Hsp70 与鳞翅目昆虫的 Hsp70 聚在一起，褐飞虱与灰飞虱的 Hsc70 与鞘翅目昆虫的 Hsp70 聚在一起，与同种的 Hsp70 基因亲缘关系较远，这一结果与张青等（2015）的结论一致。这可能与这类昆虫存在亲缘关系较近的 Hsp70 还未被鉴定出有关。但沙葱萤叶甲 Hsp70 蛋白序列与分类学关系上较为接近的鞘翅目昆虫的同源蛋白有较高的相似度。

已有报道发现 Hsp70 在调控昆虫生长发育及分化过程中扮演着重要角色，并具有组织特异性和时间顺序性（Sonoda *et al*., 2006；Sharmas *et al*., 2007）。我们的实验结果显示 *GdHsp*70 在沙葱萤叶甲成虫的胸部表达量高于腹部和头部；在整个发育阶段，*GdHsp*70 在卵期和 1 龄幼虫中表达量显著高于其他发育阶段，与对照组（雄成虫）相比，表达量分别升高了 74 倍和 10 倍。沙葱萤叶甲在田间以卵越冬，最早 4 月上中旬开始孵化，这段发育期间始终

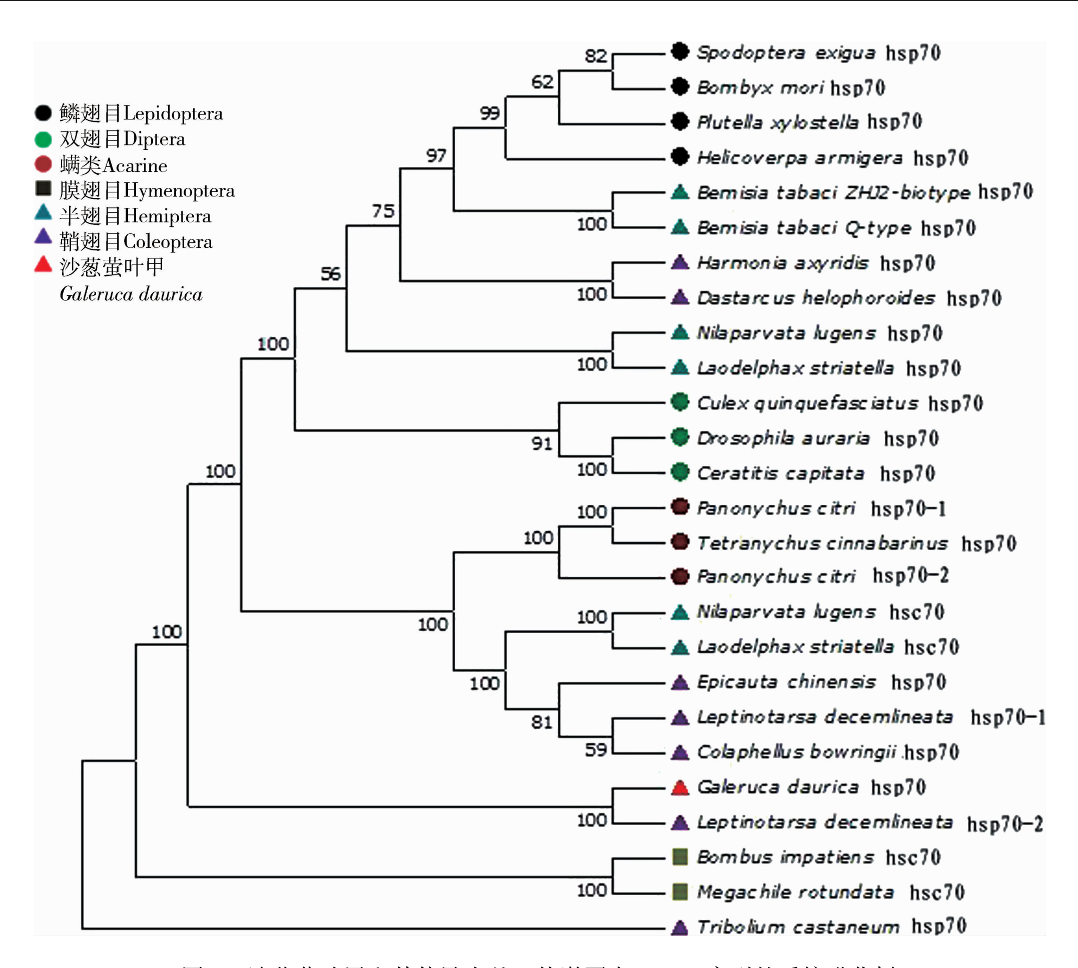


图 2　沙葱萤叶甲和其他昆虫基于热激蛋白 Hsp70 序列的系统进化树

Fig. 2　Phylognetic tree based on the amino acid sequences of Hsp70 proteins from *Galeruca daurica* and other insects

采用 Mega 6.0 软件的邻接法(NJ)生成系统发育树，进化树分支置信度检测利用 Bootstrap 进行 1 000 次计算，分支上的数值表示置信度。The tree was generated by MEGA 6.0 using the Neighbor-Joning (NJ) method. The topology was tested using bootstrap analyses (1 000 replicates). Numbers at nodes are bootstap values. 物种名称及其 HSP70 序列的 GenBank 登录号 The species names and the GenBank accession numbers of their HSP70 sequences：甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* hsp70 (FJ862049.1)；家蚕 *Bombyx mori* hsp70 (AB035326.1)；棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (HM593518.1)；小菜蛾 *Plutella xylostella* hsp70 (AB325801.1)；烟粉虱 *Bemisia tabaci* ZHJ2-biotype hsp70 (HM367079.1)；烟粉虱 *Bemisia tabaci* Q-type hsp70 (HM013709.1)；异色瓢虫 *Harmonia axyridis* hsp70 (KJ136115.1)；花绒寄甲 *Dastarcus helophoroides* hsp70 (KU050682.1)；致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* hsp70 (XM 001861403.1)；果蝇 *Drosophila auraria* hsp70 (AJ001365.1)；地中海实蝇 *Ceratitis capitata* hsp70 (XM 004536177.2)；褐飞虱 *Nilaparvata lugens* hsp70 (JQ782193.1)；灰飞虱 *Laodelphax striatella* hsp70 (KP994340.1)；桔全爪螨 *Panonychus citri* hsp70-1 (GQ495083)；桔全爪螨 *Panonychus citri* hsp70-2 (GQ495084)；朱砂叶螨 Tetranychus cinnabarinus hsp70 (EU679412.1)；褐飞虱 *Nilaparvata lugens* hsc70 (GU723301.1)；灰飞虱 *Laodelphax striatella* hsc70 (KP994340.1)；大猿叶甲 *Colaphellus bowringii* (EF668009.1)；马铃薯叶甲 *Leptinotarsa decemlineata* hsp70-1 (AHA36968.1)；中华豆芫菁 *Epicauta chinensis* hsp70 (ALJ76676.1)；沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* hsp70 (KY420426)；马铃薯叶甲 *Leptinotarsa decemlineata* hsp70-2 (AHA36969.1)；雄蜂 *Bombus impatiens* hsc70 (XP_003492512.1)；苜蓿切叶蜂 *Megachile rotundata* hsc70 (XP_003702705.1)；赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* hsp70 (EFA06541.1).

伴随着较低的温度，我们推测 *GdHsp*70 在这两个时期的高表达，很可能是帮助昆虫细胞耐受极端温度，或是组织细胞增殖、变性及一些程序性死亡的信号传递，从而保护沙葱萤叶甲度过这两个极为敏感而易遭逆境威胁的发育阶段。不同昆虫种内的 Hsp70 基因表达量在各发育阶段的变化并不一致，灰飞虱 Hsp70 基因在 1 龄若虫阶段表达量最高（张青等，2015），而二化螟 Hsp70 基因的表达量则随不同发育阶段显著变化（Lu *et al*., 2014），郝春凤等（2016）从花绒寄甲的转录组数据中挖掘出 3 个 Hsp70 基因进行全长克隆获得 *DhHSP*69.09，*DhHSP*70.11 和 *DhHSP*71.88 3 个基因，*DhHSP*69.09 在 1 龄幼虫中表达量最高，*DhHSP*70.11 和 *DhHSP*71.88 在雄成虫中表达量最高，这说明 Hsp70 的表达具有物种特异性。沙葱萤叶甲 *GdHsp*70 在不同发育阶段的差异表达，为进一步开展 *GdHsp*70 涉及生长发育的生理功

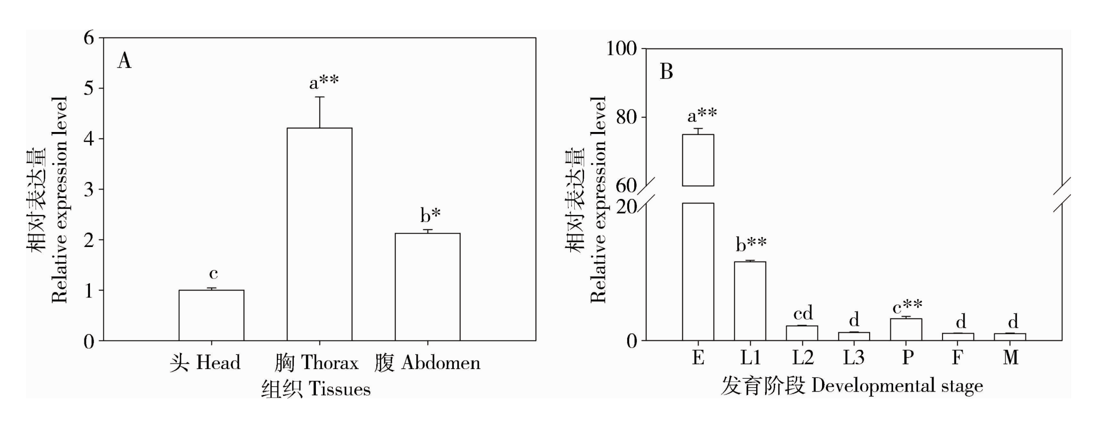


图 3 *GdHsp*70 在沙葱萤叶甲成虫不同组织中(A)和不同发育阶段(B)的表达模式

Fig. 3 Relative expression levels of *GdHsp*70 in different adult tissues (A) and developmental stages (B) of *Galeruca daurica*

E: 卵 Egg; L1: 1 龄幼虫 1st instar larva; L2: 2 龄幼虫 2nd instar larva; L3: 3 龄幼虫 3rd instar larva; P: 蛹 Pupa; F: 雌成虫 Female adult; M: 雄成虫 Male adult. 不同组织中的表达量以头部中表达量为基准,不同发育阶段的表达量以雄成虫中表达量为基准。图中数据为平均值 ± 标准差,柱上不同字母表示不同组织或发育阶段间表达量存在显著性差异($P<0.05$, ANOVA),柱上单星号表示与基准表达量差异显著($P<0.05$),双星号表示差异极显著($P<0.01$)(*t* 检验)。The expression levels of gene in different tissues and developmental stages are normalized to those in the head and male adult, respectively. Data in the figure are expressed as mean ± *SD*, different letters above bars indicate significant difference in expression level among different tissues or developmental stages ($P<0.05$, ANOVA), while single asterisk and double asterisks above bars indicates significant difference ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$) from the normalized value (*t* test), respectively.

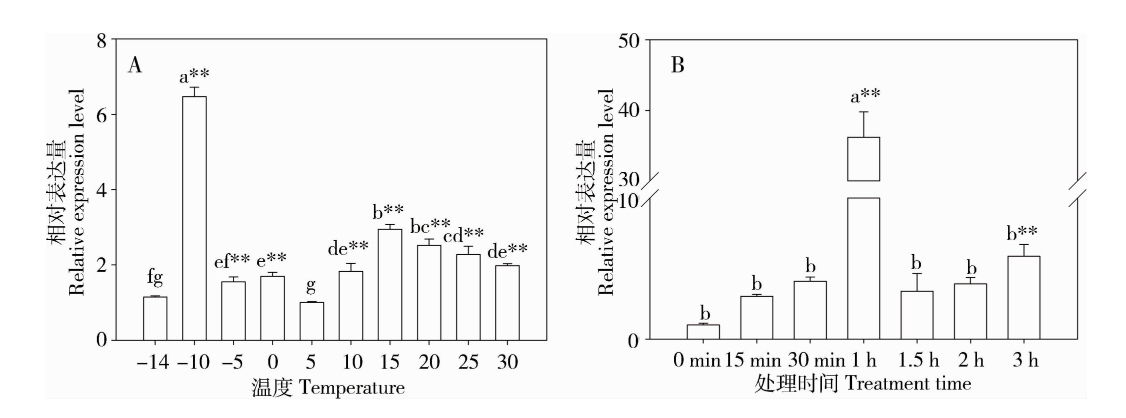


图 4 *GdHsp*70 在不同温度胁迫 1 h 的沙葱萤叶甲 2 龄幼虫(A)和 0℃低温下处理不同时间的卵中(B)的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *GdHsp*70 in the 2nd instar larvae of *Galeruca daurica* exposed to different temperatures for 1 h (A) and eggs exposed to 0℃ for different time (B)

不同温度胁迫幼虫中的表达量以 5℃下的表达量为基准,0℃胁迫不同时间卵中的表达量以未处理对照(0 min 时)的表达量为基准。图中数据为平均值 ± 标准差,柱上不同字母表示不同温度下幼虫中或 0℃胁迫不同时间卵中的表达量存在显著性差异($P<0.05$, ANOVA);柱上双星号表示差异极显著($P<0.01$)(*t* 检验)。The expression levels of gene in larvae exposed to different temperatures are normalized to that in larvae exposed to 5℃, while those in eggs exposed to 0℃ for different time are normalized to that in the untreated control (0 min). Data in the figure are expressed as mean ± *SD*, different letters above bars indicate significant difference in expression level among different stress temperatures or time points after exposure to 0℃ ($P<0.05$, ANOVA), while double asterisks above bars indicate extremely significant difference ($P<0.01$) from the normalized value (*t* test), respectively.

能的研究奠定基础。

Hsp70 是与生物体温度耐受性关系最为密切的一类蛋白质,许多报道都证实了高温和低温均能诱导生物体内 Hsp70 基因的表达(Rinehart *et al*., 2007; Yi *et al*., 2007)。沙葱萤叶甲 2 龄幼虫在内蒙古锡林郭勒草原的 4 月下旬盛发,此阶段气候变化非常不稳定,每日温度及昼夜温度变化极大,日均温度最低可达 5℃左右。2 龄幼虫又是防治的关键时期,生产上在 2 龄前进行有效防治,可以迅速控制种群密度。本研究以 2 龄幼虫作为研究对象,以 5℃处理作为基准,通过检测 *GdHsp*70 mRNA 相对表达量,探讨 *GdHsp*70 对不同低温、高温胁迫的响应。

在 0℃，－5℃ 和 －10℃ 处理下，与 5℃ 处理相比，*GdHsp*70 基因显著上调，但 －14℃ 处理所测得的 *GdHsp*70 的相对表达量没有明显变化，这与试虫的生理活性有直接关系。沙葱萤叶甲 2 龄幼虫的过冷却点为 －13.3℃（李浩等，2014），在 －14℃ 下处理 1 h，部分虫体内部已经结冰，超过一半的幼虫几乎没有明显的活动迹象，尽管我们在实验中 RNA 的质量检测过关，但是相当一部分试虫的生理生化活动基本停滞，在这样低的温度处理下，*GdHsp*70 抗低温的功能可能已经丧失。进行高温处理的沙葱萤叶甲 2 龄幼虫 *GdHsp*70 基因的相对表达量显著升高，但与温度的变化没有显现出相关性，表达量升高的倍数在 2～3 倍间。说明低温对该基因的诱导作用强于高温。热激蛋白是生物体响应高低温胁迫的重要机制之一（Sørensen *et al*.，2003），暴露在温和的高温和适度的低温下，能诱导机体内某些热激蛋白的表达，更能诱导机体的耐受能力，在之后遭受极端高、低温度时可以降低死亡率（Huang *et al*.，2007；Kang *et al*.，2009；李浩等，2014）。但是某些昆虫中某些 Hsp70 基因并不能被高、低温诱导，说明不同昆虫的不同 Hsp70 作用不尽相同。

*GdHsp*70 在沙葱萤叶甲卵期高表达，而沙葱萤叶甲又是以卵在内蒙古北方极端低温下越冬的，那么 *GdHsp*70 在卵中如何响应低温胁迫是阐述沙葱萤叶甲卵的抗寒性机制的重要依据。沙葱萤叶甲卵从体内一孵化出来就直接进入滞育，不论温度高低，都必须经历一段时间的低温诱导才能顺利孵化为幼虫（Zhou *et al*.，2016），所以所有的试虫包括对照组，都是滞育的卵。在这两个实验中，不存在因为滞育与否而影响 Hsp70 的表达变化，因为处理组与对照组的背景完全一致。我们在实验室条件下将产下 3 d 的卵用 0℃ 处理不同时间，*GdHsp*70 基因的表达量先有所上调，但差异不显著，1 h 后相对表达量高达 36 倍，之后下调，3 h 时检测表达量与对照组相比达 5.87 倍。我们推测沙葱萤叶甲中 *GdHsp*70 基因表达量与低温诱导时间呈正相关到达高峰后又下调，可能与环境胁迫达到一定时间后，变性蛋白产生过多从而抑制了 *GdHsp*70 的表达有关。有学者认为，热激蛋白的诱导虽然有助于提高生物体的抗逆能力，但是会消耗大量能量，影响其他功能蛋白或结构蛋白的合成，甚至出现寿命缩短、生殖力下降等（Shen *et al*.，2014），所以显著诱导是短暂、不稳定的。沙葱萤叶甲卵中 *GdHsp*70 基因在低温处理下的表达变化模式，在一些昆虫经热激后热激蛋白的表达模式研究中都有相似的结果（韩岚岚等，2014）。因此，我们认为调节 *GdHsp*70 基因的表达可能是沙葱萤叶甲卵抗寒的重要生理手段。

参考文献（References）

Boorstein WR，Ziegelhoffer T，Craig EA，1994. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J. Mol. Evol*.，38（1）：1－17.

Boutet I，Tanguy A，Rousseau S，Auffret M，Moraga D，2003. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70（hsc70）and heat shock protein 70（hsp70）genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress Chaperon*.，8（1）：76－85.

Clark MS，Peck LS，2009. Triggers of the HSP70 stress response：environmental responses and laboratory manipulation in an Antarctic marine invertebrate（*Nacella concinna*）. *Cell Stress Chaperon*.，14（6）：649－660.

Daugaard M，Rohde M，Jäättelä M，2007. The heat shock protein 70 family：highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett*.，581（19）：3702－3710.

Feder ME，Hofmann GE，1999. Heat-shock proteins，molecular chaperones，and the stress response：evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol*.，61（1）：243－282.

Franzellitti S，Fabbri E，2005. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochem. Biophys. Res. Commun*.，336（4）：1157－1163.

Gao JC，Zhou XR，Pang BP，Bao X，Luo JP，Erdeng Q，2015. Effects of low temperature on the survivorship and development of overwintering eggs of *Galeruca daurica*（Coleoptera：Chrysomelidae）. *Acta Entomol. Sin*.，58（8）：881－886.［高靖淳，周晓榕，庞保平，包祥，罗建平，额尔登其木格，2015. 低温对沙葱萤叶甲越冬卵存活和发育的影响. 昆虫学报，58（8）：881－886］

Gkouvitsas T，Kontogiannatos D，Kourti A，2009. Cognate Hsp70 gene is induced during deep larval diapause in the moth *Sesamia nonagrioides*. *Insect Mol. Biol*.，18（2）：253－264.

Han LL，Zhu MH，Dong TY，Zhao KJ，Qu ZC，Lv Y，Han XX，2014. Effects of heat shock and imidacloprid on the expressions of *hsp*70 and *hsc*70 mRNA in the *Aphis glycines*（Hemiptera：Aphididae）. *Acta Entomol. Sin*.，57（4）：387－394.［韩岚岚，朱明贺，董天宇，赵奎军，曲忠诚，吕洋，韩晓旭，2014. 热应激和吡虫啉对大豆蚜 *hsp*70 和 *hsc*70 基因 mRNA 表达的影响. 昆虫学报，57（4）：387－394］

Hao CF，Wang HP，Zhang ZQ，Chang Y，Li ML，2016. Characterization and expression analysis of *HSP*70 gene in *Dastarcus helophoroides*. *J. Northeast For. Univ*.，44（7）：108－124.［郝春凤，王化鹏，张正青，常勇，李孟楼，2016. 花绒寄甲 *HSP*70 基因的特征与表达. 东北林业大学学报，44（7）：108－124］

Hao X，Zhou XR，Pang BP，Zhang ZR，Bao X，2015. Morphological and biological characteristics of *Galeruca daurica* Joannis. *Acta Agrestia Sin*.，23（5）：1106－1108.［吴翔，周晓榕，庞保平，张卓然，包祥，2015. 沙葱萤叶甲形态特征与生物学特性的研究. 草地学报，23（5）：1106－1108］

Huang LH, Chen B, Kang L, 2007. Impact of mild temperature hardening on thermotolerance, fecundity, and Hsp gene expression in *Liriomyza huidobrensis*. *J. Insect Physiol*., 53: 1199 – 1205.

Huang LH, Kang L, 2007. Cloning and inter specific altered expression of heat shock protein genes in two leaf miner species in response to thermal stress. *Insect Mol. Biol*., 16(4): 491 – 500.

Jiang JJ, Huang LF, Chen HS, Yang L, 2015. Identification of reference genes and expression analysis of heat shock protein genes in the brown plant hopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae), after exposure to heat stress. *Acta Entomol. Sin*., 58(5): 479 – 486.

Jing XH, Kang L, 2003. Geographical variation in egg cold hardiness: a study on the adaptation strategies of the migratory locust *Locusta migratoria* L. *Ecol. Entomol*., 28: 151.

Kang L, Chen B, Wei JN, Liu TX, 2009. Roles of thermal adaptation and chemical ecology in *Liriomyza* distribution and control. *Annu. Rev. Entomol*., 54: 127 – 145.

King AM, MacRae TH, 2015. Insect heat shock proteins during stress and diapause. *Annu. Rev. Entomol*., 60: 59 – 75.

Li H, Zhou XR, Pang BP, Chang J, 2014. Supercooling capacity and cold hardiness of *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomol. Sin*., 57(2): 212 – 217. [李浩, 周晓榕, 庞保平, 常静, 2014. 沙葱萤叶甲的过冷却能力与抗寒性. 昆虫学报, 57(2): 212 – 217]

Li H, Zhou XR, Pang BP, Zhang ZR, Chang J, Shan YM, 2015. Effects of low temperature stress on the supercooling capacity and development of *Galeruca daurica* Joannis larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Chin. J. Appl. Entomol*., 52(2): 434 – 439. [李浩, 周晓榕, 庞保平, 张卓然, 常静, 单艳敏, 2015. 低温胁迫对沙葱萤叶甲幼虫过冷却能力及生长发育的影响. 应用昆虫学报, 52(2): 434 – 439]

Li M, Lu WC, Feng HZ, Yuan L, Wang JJ, He L, 2008. Cloning and expression analysis of a heat shock protein 70 gene *TCHSP*70-4 from *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae). *Acta Entomol. Sin*., 51(12): 1235 – 1243. [李明, 卢文才, 冯宏祖, 袁亮, 王进军, 何林, 2008. 朱砂叶螨热激蛋白 HSP70 基因 *TCHSP*70-4 的克隆与表达. 昆虫学报, 51(12): 1235 – 1243]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods*, 25: 402 – 408.

Lu MX, Liu ZX, Cui YD, Du YZ, 2014. Expression patterns of three heat shock proteins in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Ann. Entomol. Soc. Am*., 107(3): 667 – 673.

Rinehart JP, Li AQ, Yocum GD, Robich RM, Hayward SA, Denlinger DL, 2007. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(27): 11130 – 11137.

Schmid D, Baici A, Gehring H, Christen P, 1994. Kinetics of molecular chaperone action. *Science*, 263(5149): 971 – 973.

Sharmas S, Rohilla MS, Tiwari PK, 2007. Developmental and hyperthermia-induced expression of the heat shock proteins HSP60 and HSP70 in tissues of the housefly *Musca domestica*: an *in vitro* study. *Genet. Mol. Biol*., 30(1): 159 – 168.

Shen HT, Zhu HC, Song MW, Tian YL, Huang YF, Zheng H, Cao RY, Lin J, Bi ZG, Zhong W, 2014. A selenosemicarbazone complex with copper efficiently down-regulates the 90-kDa heat shock protein HSP90AA1 and its client proteins in cancer cells. *BMC Cancer*, 14: 629.

Shi JH, Fu MJ, Zhao C, Zhou FL, Yang QB, Qiu LH, 2016. Characterization and function analysis of Hsp60 and Hsp10 under different acute stresses in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Cell Stress Chaperon*., 21: 295 – 312.

Si FL, He ZB, Chen B, 2016. Cloning and expression profiling of heat shock protein DaHSP23 gene in the winter and summer diapause pupae of the onion maggot, *Delia antique* (Diptera: Anthomyiidae). *Acta Entomol. Sin*., 59(4): 402 – 410. [司风玲, 何正波, 陈斌, 2016. 葱蝇热激蛋白 DaHSP23 基因的克隆及在冬滞育和夏滞育蛹中的表达分析. 昆虫学报, 59(4): 402 – 410]

Sonoda S, Ashfaq M, Tsumuki H, 2006. Cloning and nucleotide sequencing of three heat shock protein genes (*hsp*90, *hsc*70 and *hsp*19.5) from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and their expression in relation to developmental stage and temperature. *Arch. Insect Biochem. Physiol*., 62(2): 80 – 90.

Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V, 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett*., 6(11): 359 – 353.

Tan Y, Zhou XR, Pang P, 2016. Reference gene selection and evaluation for expression analysis using qRT-PCR in *Galeruca daurica* (Joannis). *Bull. Entomol. Res*., 107(3): 359 – 368.

Wu SJ, Liu FH, Hu SM, Wang C, 2001. Different combinations of the heat-shock cognate protein 70 (hsc70) C-terminal functional groups are utilized to interact with distinct tetratricopeptide repeat-containing proteins. *Biochem. J*., 359: 419 – 426.

Yang LH, Jiang HB, Liu YH, Dou W, Wang JJ, 2012. Molecular characterization of three heat shock protein 70 genes and their expression profiles under thermal stress in the citrus red mite. *Mol. Biol. Rep*., 39: 3585 – 3596.

Yang XK, Huang DC, Ge SQ, Bai M, Zhang RZ, 2010. One million mu of meadow in Inner Mongolia suffer from the harm of breaking out of *Galeruca daurica* (Joannis). *Chin. Bull. Entomol*., 47(4): 812. [杨星科, 黄顶成, 葛斯琴, 白明, 张润志, 2010. 内蒙古百万亩草场遭受沙葱萤叶甲暴发危害. 昆虫知识, 47(4): 812]

Yi SX, Moore CW, Lee RE, 2007. Rapid cold-hardening protects *Drosophila melanogaster* from cold-induced apoptosis. *Apoptosis*, 12(7): 1183 – 1193.

Zhang PF, Zhou XR, Pang BP, Chang J, Shan YM, Zhang ZR, 2015. Microsatellite marker analysis of the genetic diversity of *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) populations from Inner Mongolia. *Acta Entomol. Sin*., 58(9): 1005 – 1011. [张鹏飞, 周晓榕, 庞保平, 常静, 单艳敏, 张卓然, 2015. 内蒙古沙葱萤叶甲种群遗传多样性的微卫星分析. 昆虫学报, 58(9): 1005 – 1011]

Zhang Q，Lu MX，Zhu SD，2015. Cloning，sequence analysis and expression profiling of two heat shock protein 70 genes in small brown plant hopper，*Laodelphax striatellus*（Hemiptera：Delphacidae）. *Jiangsu J. Agric. Sci.*，31（6）：1257－1264.［张青，陆明星，祝树德，2015. 灰飞虱 2 种热激蛋白基因 *Hsp*70 的克隆、分析. 江苏农业学报，31（6）：1257－1264］

Zhou XR，Gao JC，Pang BP，2016. Effects of temperature on the termination of egg diapause and post-diapause embryonic development of *Galeruca daurica*（Coleoptera：Chrysomelidae）. *Environ. Entomol.*，45（4）：1076－1080.

（责任编辑：马丽萍）